



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11276170 A**(43) Date of publication of application: **12 . 10 . 99**

(51) Int. Cl.

**C12N 15/09**  
**//(C12N 15/09 , C12R 1:69 )**
(21) Application number: **10105712**(22) Date of filing: **31 . 03 . 98**(71) Applicant: **AMANO PHARMACEUT CO  
LTD AGENCY OF IND SCIENCE &  
TECHNOL**(72) Inventor: **MACHIDA MASAYUKI  
YAMAGUCHI SHOTARO****(54) NEW PROMOTER DERIVED FROM GENUS  
ASPERGILLUS****(57) Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new promoter comprising a DNA derived from the genus *Aspergillus* having a specific base sequence and allowing a mold belonging to the genus *Aspergillus* transformed by a vector comprising the DNA sequence to produce a foreign protein.

**SOLUTION:** This new promoter is shown by a base sequence of, e.g. formula I or II and derived from *Aspergillus oryzae* belonging to the genus *Aspergillus*, and a foreign protein may be produced by a mold belonging to the genus *Aspergillus* transformed by a vector comprising the promoter sequence. The promoter is obtained by extracting the whole DNA from *Aspergillus oryzae* grown in the presence of glucose, passing it through an oligo(dT)cellulose column to separate mRNA therefrom, synthesizing cDNA by using it, conventionally forming a cDNA library, and cloning it so as to search a gene highly expressed, thus obtaining the resultant promoter comprising e.g. an alcohol dehydrogenase gene strongly expressed in the presence of glucose.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

ATCAATTAA AGCCTATAGA TCGCTANGAC TTTCGGGGCC ATACAGATGC GAGCTGTGGA 60  
 AACGGGCTTG CTTTGGTTTG ACACCATANG CTATCTGGT GTTACAGCG TACCAACAC 120  
 GTGACACAGG ATTCCTATA TTCTCTACAT CATAGACATG TCAACATTI CAGACATCC 180

I

TTGATTTTA GAGTCTATA AGAATCTCC AGGCTCTAC CATCAGCTTA CTTCATCTTC 1740  
 TCATCACTTC TCTCATCGTG TAAATCAATC CTACTCTAC CCGAAGCTCC TTCTCTCGCT 1800  
 TTCTTCACAC ACAAGATGCC AAGTCAAA 1829

CAGTATTTC GTTACTGCG TCGACCTTA CCAATTCCTT GCATTCAGTG ACACACTGT 60  
 CAGATTITTT ATACGCCAAT AAACGCATG CCAATTCCTT CAGACATCA CAGCTCAGC 120  
 AGACATCAGG TGGTCTCTTG TGGTGGCTGT ACTATCAAAA CCAATCAATT CCAATTCCT 180

II

CGGCGCGGCG GATGACTTC TGAATCCAG GTGGGCTCA CAAATCAAGA ATTCACAG 1560  
 CATCAGATTC CACACACAG ATCTACCGA TTCTCTCTCT ACAGACCTTC CTTCAGCAT 1620  
 ATTCGCCAA G 1631

(51) IntCl.<sup>6</sup>  
C 1 2 N 15/09  
// (C 1 2 N 15/09  
C 1 2 R 1:69)

識別記号  
ZNA  
ZNA

F I  
C 1 2 N 15/00 ZNAA

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平10-105712  
(22) 出願日 平成10年(1998) 3月31日

(71) 出願人 000216162  
天野製薬株式会社  
愛知県名古屋市中区錦 1 丁目 2 番 7 号  
(71) 出願人 000001144  
工業技術院長  
東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号  
(72) 発明者 町田 雅之  
茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 工業技術  
院生命工学工業技術研究所内  
(72) 発明者 山口 庄太郎  
イギリス、22 キャンスタブル ロード  
イートン、ナルニッチ NR4 6RN  
(74) 指定代理人 工業技術院生命工学工業技術研究所長

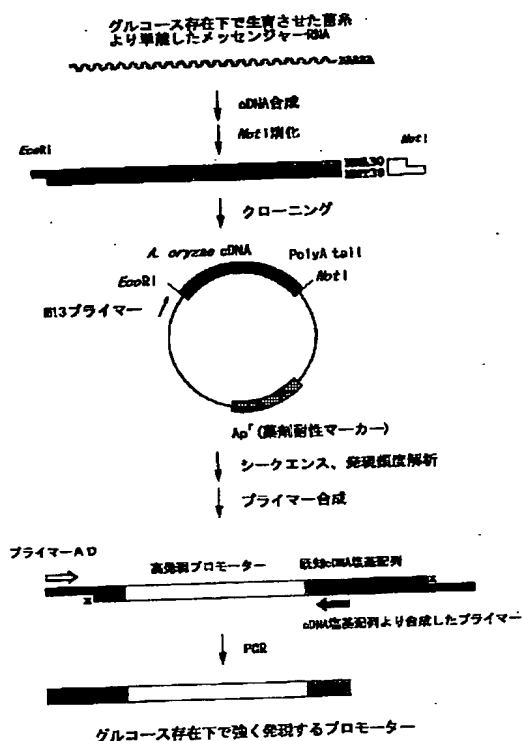
(54) 【発明の名称】 アスペルギルス属由来の新規なプロモーター

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属糸状菌の新規プロモーターを提供する。

【構成】 アスペルギルス・オリゼのアルコール・デヒドロゲナーゼ I (alcoholdehydrogenase I) 遺伝子、コプロポルヒリノーゲン III オキシダーゼ (coproporphyrinogen III oxidase) 遺伝子、ヘキソース・トランスポーター (hexosetransporter) 遺伝子、ヒストン H4.1 (histon H4.1) 遺伝子、40S リボソーム蛋白質 S17 (40S ribosomal protein S17) 遺伝子又は 40S リボソーム蛋白質 S28 (40S ribosomal protein S28) 遺伝子のプロモーター。

一。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：1乃至配列番号：6に示した塩基配列で示されるDNA。

【請求項2】 請求項1記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項3】 アスペルギルス属由来である請求項1又は請求項2記載のプロモーター。

【請求項4】 アスペルギルス・オリゼ由来である請求項1又は請求項2記載のプロモーター。

【請求項5】 アスペルギルス・オリゼのアルコール・デヒドロゲナーゼI (alcohol dehydrogenase I) 遺伝子、コプロポルフィリンノーゲンIIIオキシダーゼ (coproporphyrinogen III oxidase) 遺伝子、ヘキソース・トランスポーター (hexose transporter) 遺伝子、ヒストンH4.1 (histon H4.1) 遺伝子、40Sリボソーム蛋白質S17 (40S ribosomal protein S17) 遺伝子、40Sリボソーム蛋白質S28 (40S ribosomal protein S28) 遺伝子の何れかより選ばれた請求項4記載のプロモーター。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術】 本発明は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属糸状菌の新規プロモーターに関する。更に詳細には、本発明はアスペルギルス・オリゼ由来の新規プロモーター配列をクローニングし、アスペルギルス属糸状菌を宿主として有用蛋白質およびペプチドを発現させるために必要なDNA断片を有するプラスミドと、それを用いた有用蛋白質およびペプチドの製造法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 糸状菌は、デンプン、蛋白質、脂質、セルロース等を加水分解する各種加水分解酵素をはじめ多くの有用酵素を菌体外に多量に分泌するため、古くよりこれら有用酵素の給源として利用されてきた。従って、糸状菌に関する培養法、生成物蛋白質の分離精製法などの発酵技術の古い歴史と研究成果の裏付けがあり、多くの菌株の安全性が広く認知されている。また、真核生物であるが故に哺乳動物などの高等生物と同様に蛋白質の糖鎖付加機構を有している。

【0003】 これらの理由により、糸状菌を異種蛋白質の高生産用宿主として利用することが期待されていた。遺伝子工学技術においては、目的とする蛋白質の生産量は、プロモーター、ターミネーターなどの転写に関わる因子、アミノ酸コドンの種類など翻訳に関わる因子、蛋白質への糖鎖付加、発現した蛋白質の細胞内での存在様式 (分泌過程における移動も含む) などの翻訳後に関わる因子、遺伝子のコピー数の因子、宿主由来のプロテアーゼなど発現蛋白質の安定性に関わる因子など多くの因子により影響を受ける。これらのうちもっとも重要であり制御しやすい因子は、プロモーターの選択である。

【0004】 この見地から、糸状菌における強力なプロ

モーターを利用した例は、たとえばアスペルギルス・ニガー由来のグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター [Biotechnology, 5, 368 (1987)]、トリコデルマ・リーセイ由来のセロビオハイドロラーゼI 遺伝子のプロモーター [Biotechnology, 7, 596 (1989)]、アスペルギルス・オリゼ由来の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のプロモーター [Biotechnology, 6, 1419 (1988)] (特開昭62-272988)、アスペルギルス・ニドランス由来のアルコールデヒドロゲナーゼI 遺伝子のプロモーター [Biotechnology, 5, 713 (1987)]、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニガーのグリセルアルデヒド-3-ホスフェイト デヒドロゲナーゼ (GAP-DH) のプロモーターを利用して異種蛋白質の製造 (特開平3-187392) の場合などがある。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明はアスペルギルス・オリゼ由来の新規なプロモーターを得、この発現系を使用して異種蛋白質を製造する方法を提供することにある。

## 20 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記目的を達成するために鋭意研究し、アスペルギルス・オリゼから新規なプロモーター配列をクローニングすることに成功し、本発明を完成した。即ち、本発明によりアスペルギルス・オリゼ由来の新規なプロモーターが提供され、それを使用する点で新規なものである。

【0007】 本発明においては、以下のようにして上記の目的を達することが出来た。例えば、グルコース存在下で強く発現する遺伝子の同定と単離は、以下のようにしてできる。

【0008】 糸状菌をグルコースを唯一の炭素源とした培地で培養し、得られた菌体からポリA付加RNAを取得する。このポリA付加RNAを用いてcDNAを合成し、適当なベクターを用いてcDNAライブラリーを構築する。

【0009】 このライブラリーの中から独立したクローンを無作為に多数、例えば500個選別 (約8,000遺伝子で構成されている麹菌であれば約500個で推定できると考えられる。) し、プラスミドDNAを抽出して約800bpの塩基配列を解析する。

【0010】 こうして得られた塩基配列は、各cDNAのコード領域を5'末端領域の塩基配列を含み、DNA塩基配列データベースに対して相同性解析を行うことにより、含まれる遺伝子を推定する。さらに、全ての塩基配列間で総当たりで相同性検索を行うことにより、それぞれのcDNAの頻度解析を行い、培地中のグルコース存在下で強く発現している遺伝子を同定することができる。

【0011】 次に、この様にして同定したグルコース存在下で強く発現している遺伝子のプロモーターの単離

は、通常よく用いられる方法、即ち上記で得られた各 cDNA をプローブにして遺伝子ライブラリーからスクリーニングすること等により成し遂げられるし、或いは PCR (Polymerase chain reaction) を用いる方法によっても成し遂げられる。

【0012】PCRを用いる方法の一例として、以下の方法を用いることが出来る。糸状菌からゲノムDNAを抽出してEcoRV、ScaI、DraI、PvuIIあるいはSspI等の6bpを認識して平滑末端に切断するそれぞれの制限酵素で完全消化し、そのゲノムDNA断片の両端に適当なアダプターを連結する。

【0013】この両端にアダプターが連結されたゲノムDNA断片を鋳型として、cDNAの塩基配列から合成したプライマーおよびアダプターの一本鎖部分の配列を有するプライマーを用いてPCRを行う。増幅産物を電気泳動で確認して1~2kbp程度の長さを有するDNA断片を電気泳動によって単離・精製し、適当なクローニングベクターに連結して大腸菌にクローニングする。

【0014】数個の独立したクローンからプラスミドを調製してクローニングしたDNA断片の両末端の塩基配列を解析し、cDNAと相同な塩基配列を有しcDNAの上流に位置するDNA断片をこのcDNA由来の遺伝子のプロモーターと判断する。

【0015】プロモーター領域を有するDNA断片のうち、翻訳開始コドンより上流1kbp程度以上を有するDNA断片を選別し、全塩基配列を決定し、グルコース存在下で強く発現している遺伝子のプロモーターの単離を行うことが出来る。上述した工程を図1に示す。

【0016】本発明のプロモーターは上述のようにして決定された塩基配列に対してストリンジェントな条件、例えば、0.1% SDS (60℃、0.3mol NaCl、0.03M クエン酸ソーダ) でハイブリダイズする塩基配列をも包含する。

【0017】本発明のプロモーターは、その下流に、所望の有用タンパク質遺伝子を連結してベクターを構築し、該ベクターで宿主を形質転換し、それを培養することにより、有用タンパク質を著量生産させることができる。

【0018】宿主としては、アスペルギルス・オリゼをはじめ、その他のアスペルギルス属、ノイロスポラ属、ペニシリウム属、トリコデルマ属などの微生物が使用できる。特に、発現効率の点から、宿主として、アスペルギルス・オリゼを用いることが好ましい。

【0019】得られたプロモーターへの有用タンパク質遺伝子の連結、ベクターへの挿入は、それ自体公知の方法で行うことができる。有用タンパク質遺伝子としては、特に限定するものではない。また、ベクターとしては、アルギニン要求性などの栄養要求性相補遺伝子、アセトアミド資化などの炭素、窒素源資化遺伝子、オリゴマイシン耐性などの薬剤耐性遺伝子などが挙げられる。

【0020】宿主の形質転換も自体公知の方法で行うことができる。また、該形質転換体の培養も常法に従って、所望のタンパク質に適した培地、培養条件を適宜選択することにより行うことができ、得られたタンパク質の採取、精製も公知の方法で行うことができる。

【0021】以下、実施例を参照しながら本発明を詳細に説明するが、実施例に使用したプラスミドなどは一例として挙げたものであり、本発明に使用できるものであればこれらに限定されるものではない。

#### 【0022】

#### 【実施例】実施例1 グルコース存在下で高発現する遺伝子の同定

##### (1) 菌体の取得

アスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae) ATCC 42149を以下の培養条件で培養した。YPD培地 (酵母エキス1%、ポリペプトン2%及びグルコース2%よりなる培地 (pH6.0) に本菌株を接種し、30℃において22時間通気攪拌培養し、菌体をろ過して得た。得られた湿菌体4gを液体窒素中で凍結し、そのまま、液体窒素及び海砂を入れた乳鉢に移し、乳棒で微細な粉末とした。

##### 【0023】(2) cDNAライブラリーの作製

シグイン (Chigwin) 等の方法 [バイオケミストリー (Biochemistry)、18巻、5294頁 (1979)] に従って4.6mgの全RNAを得た。その後、オリゴ (dT) セルロース・カラム (ファルマシア社) に供し、1.4mgの全RNAから30μgのポリA付加RNA画分を得た。

【0024】このポリA付加RNAを用いて、NotI制限酵素切断部位を含むプライマー (5'-TTCTAGAATTCAGCGCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3' : ここでVはA, C, Gの混合、NはA, C, G, Tの混合を表す) 及びMMLVリバーストランスクリプターゼ (RNaseH) (クロンテック) [逆転写酵素]を用いて一本鎖cDNAを合成し、さらにE. coli DNA polymerase I (クロンテック)、E. coli DNA ligase (クロンテック) およびE. coli RNase H (クロンテック) により、両端が平滑化された二本鎖のcDNAとした。

【0025】cDNA分離用カラム (クロンテック) を用いたゲル濾過により短鎖cDNAを除去した後、EcoRI制限酵素切断部位を含むアダプター (5'-AATTCGACACGAGG-3' 及び5'-CCTCGTCCG-3') を連結した。

【0026】こうして得られたcDNA断片は、NotI制限酵素で完全消化した後、EcoRIおよびNotI制限酵素で消化したプラスミドベクターpUC19に連結した。このプラスミドを大腸菌に形質転換することにより、ほぼ完全長のcDNAを含む大腸菌cDNAライブラリーを構築した。

##### 【0027】(3) 高発現する遺伝子の探索

このライブラリーの中から独立したクローンを無作為に500個選別し、プラスミドDNAを抽出して、M13ユニバーサルプライマー (5'-CACGACGTTGTAACGAC-

10

20

30

40

50

3')、Taq DNAポリメラーゼ (パーキン・エルマー社)、DNAサーマル・サイクラー (パーキン・エルマー社) 及びDNAシーケンサー (LI-COR社、モデル4000L) を用いたサイクル・シーケンシング法により約800bpの塩基配列を解析した。

【0028】こうして得られた塩基配列は、各cDNAの5'末端領域の塩基配列を含んでいる。GenBank DNA塩基配列データベースに対して、BLASTXを用いて相対性解析を行うことにより、含まれる遺伝子を推定し \*

Gene name	Score	Source
Alcohol dehydrogenase I	11	Af
Coproporphyrinogen III oxidase	4	Sc
Hexose transporter	5	Sc
Histon H4.1	4	An
40S Ribosomal protein S17	2	Sc
40S Ribosomal protein S28	2	Sc

【0031】表中においては、以下のように示す。

Score :ランダムに選んだ600のcDNA配列解析での出現頻度

Source :GenBankデータベースに対するホモロジーサーチでヒットしたもの

Sc=Saccharomyces cerevisiae

Af=Aspergillus flavus

An=Aspergillus nidulans

【0032】その結果、グルコース存在下で強く発現している遺伝子としてアルコール・デヒドロゲナーゼI (alcohol dehydrogenase I) 遺伝子、コプロポルフィリンノーゲンIIIオキシダーゼ (coproporphyrinogen III oxidase) 遺伝子、ヘキソース・トランスポーター (hexose transporter) 遺伝子、ヒストンH4.1 (histon H4.1) 遺伝子、40Sリボソーム蛋白質S17 (40S ribosomal protein S17) 遺伝子、40Sリボソーム蛋白質S28 (40S ribosomal protein S28) 遺伝子を新たに発見した。

【0033】実施例2 アルコール・デヒドロゲナーゼ※

H <sub>2</sub> O	20.25	μl	
[10×]Reaction buffer	2.5	μl	[1×]
dNTPs, Mix 10 mM	0.5	μl	200 μM
センスプライマー(プライマー-AD)	0.25	μl	5 μM
アンチセンスプライマー(プライマー-#1)	0.25	μl	5 μM
*template(DNA 0.2 μg)	1	μl	
Expand HF DNAポリメラーゼミックス	0.25	μl	1.25 u / TEST
	25	μl	

\*EcoRV分解したDNAを0.2 μg / 10 μl になるようにTEでといたもの

【0036】上記の反応液25 μl を0.2 ml 反応チューブ中で混合してDNA Thermal Cyclerにセットし、以

きた。

【0029】さらに、Sequencher (GeneCodes社) を用いて全ての塩基配列間で総当たりで相対性検索を行うことにより、それぞれのcDNAの頻度解析を行い、培地中のグルコース存在下で強く発現している遺伝子のリストを作製した。

【0030】

【表1】

※IのcDNAに対応するのプロモーター領域の取得

Aspergillus oryzae RIB-40株 (ATCC 42149) からティンバレークとバーナード (Timberlake and Bernard) の方法に従って得たゲノムDNAを、6 bp を認識して平滑末端に切断するEcoRVで完全消化し、(P)5'-ACCTGCCC-3' (NH2) および5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCGGGCAGGT-3' からなるアダプターを連結した。

【0034】このゲノムDNA断片を鋳型とし、センスプライマーとしてアダプターの本鎖部分の配列を有するプライマーAD (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3') を、アンチセンスプライマーとしてアルコール・デヒドロゲナーゼI cDNAの塩基配列から合成したプライマー#1 (5'-ACGAGGGGCATCTTCACTGGGAGG-3') を用いてPCRを行った。PCR反応は、Expand HF (ベリンガー・マンハイム社) を用い、DNAサーマル・サイクラー (パーキン・エルマー社) により行った。反応溶液の組成は以下の通りである。

【0035】

(終濃度)

下のような温度設定によりステップダウンPCRを行った。

## 【0037】

95℃、1分 1サイクル

95℃、30秒 74℃、15秒 70℃、3分 3サイクル

95℃、30秒 70℃、15秒 70℃、3分 3サイクル

95℃、30秒 66℃、15秒 70℃、3分 3サイクル

95℃、30秒 62℃、15秒 70℃、3分 3サイクル

95℃、30秒 58℃、15秒 70℃、3分 3サイクル

95℃、30秒 54℃、15秒 70℃、3分 20サイクル

【0038】増幅産物を1.5%アガロース・ゲル電気泳動で確認して2.0kbのDNA断片を得た。このDNA断片をアガロース・ゲル中より単離・精製し、TAクローニングベクターpCRII（インビトロジェン社）に連結して大腸菌にクローニングした。

【0039】そのクローンからプラスミドを調製してクローニングしたDNA断片の両末端の塩基配列を解析し、本DNA断片がアルコール・デヒドロゲナーゼIと相同な塩基配列及びその上流に翻訳開始コドンより上流1829bpのDNA領域を含むことを確認した。

【0040】この様にして、1829bpのアルコール・デヒドロゲナーゼI遺伝子のプロモーターを取得した。その全塩基配列を決定し、配列番号：1に示す。

【0041】実施例3 コプロボルヒリノーゲンIIIオキシダーゼのcDNAに対応するプロモーター領域の取得

実施例2と同様にして、コプロボルヒリノーゲンIIIオキシダーゼ遺伝子のプロモーターを取得した。この場合、アスペルギルスオリゼのゲノムDNAを完全消化する際に、6bpを認識して平滑末端に切断する制限酵素としてDraIを用いた。

【0042】また、アンチセンスプライマーとして、コプロボルヒリノーゲンIIIオキシダーゼcDNAの塩基配列から合成したプライマー#2（5'-GATCGCTTTTCGCTGAGTATCTG-3'）を用いた。こうして得られた1887bpのコプロボルヒリノーゲンIIIオキシダーゼ遺伝子のプロモーターの全塩基配列を配列番号：2に示す。

【0043】実施例4 ヘキソース・トランスポーターのcDNAに対応するプロモーター領域の取得

実施例2と同様にして、ヘキソース・トランスポーター遺伝子のプロモーターを取得した。この場合、アスペルギルスオリゼのゲノムDNAを完全消化する際に、6bpを認識して平滑末端に切断する制限酵素としてEcoRVを用いた。

【0044】また、アンチセンスプライマーとして、ヘキソース・トランスポーターcDNAの塩基配列から合成したプライマー#3（5'-CTGGGTAGGAGTATCGGAGTGCT-3'）を用いた。こうして得られた2091bpのヘキソース・トランスポーター遺伝子のプロモーターの全塩基配列を配列番号：3に示す。

【0045】実施例5 ヒストンH4.1のcDNAに対するプロモーター領域の取得

実施例2と同様にして、ヒストンH4.1遺伝子のプロモーターを取得した。この場合、アスペルギルスオリゼのゲノムDNAを完全消化する際に、6bpを認識して平滑末端に切断する制限酵素としてSspIを用いた。

【0046】また、アンチセンスプライマーとして、ヒストンH4.1cDNAの塩基配列から合成したプライマー#4（5'-AGGTTGAGTGGGAAAATGTGGAGA-3'）を用いた。こうして得られた1915bpのヒストンH4.1遺伝子のプロモーターの全塩基配列を配列番号：4に示す。

10 【0047】実施例6 40Sリボソーム蛋白質S17のcDNAに対するプロモーター領域の取得

実施例2と同様にして、40Sリボソーム蛋白質S17遺伝子のプロモーターを取得した。この場合、アスペルギルスオリゼのゲノムDNAを完全消化する際に、6bpを認識して平滑末端に切断する制限酵素としてEcoRVを用いた。

【0048】また、アンチセンスプライマーとして、40Sリボソーム蛋白質S17 cDNAの塩基配列から合成したプライマー#5（5'-GCTTGGGTAGTAACGCTCAATGA-3'）を用いた。こうして得られた1569bpの40Sリボソーム蛋白質S17遺伝子のプロモーターの全塩基配列を配列番号：5に示す。

【0049】実施例7 40Sリボソーム蛋白質S28のcDNAに対するプロモーター領域の取得

実施例2と同様にして、40Sリボソーム蛋白質S28遺伝子のプロモーターを取得した。この場合、アスペルギルスオリゼのゲノムDNAを完全消化する際に、6bpを認識して平滑末端に切断する制限酵素としてSspIを用いた。

30 【0050】また、アンチセンスプライマーとして、40Sリボソーム蛋白質S28 cDNAの塩基配列から合成したプライマー#6（5'-AAGCACCACCGAAGGGAGAGGACT-3'）を用いた。こうして得られた1631bpの40Sリボソーム蛋白質S28遺伝子のプロモーターの全塩基配列を配列番号：6に示す。

【0051】実施例8 アルコール・デヒドロゲナーゼI遺伝子プロモーターによる大腸菌由来β-グルクロニダーゼのアスペルギルス・オリゼでの発現

(1) 大腸菌由来β-グルクロニダーゼ遺伝子発現カセットの構築

実施例2で取得した約2.0kbのDNA断片を鋳型にして、PCRによりアルコール・デヒドロゲナーゼI遺伝子プロモーターを含む1.0kbのDNA断片を得た。PCR反応に用いたプライマーは、  
センスプライマー：5'-GTCGACGAAGTATTACGGAGTACATAGC-3'  
アンチセンスプライマー：5'-GTCGACTTTGACTTTGGGATCTTGTT-3'  
であった。

50 【0052】この断片を制限酵素SalI消化後、大腸菌

由来 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子を有するプラスミドpBR J275 (4.5 kb、クロンテック社)のSalI部位に挿入し、転写方向が順方向に挿入されたプラスミドpBRJAP (5.5 kb)を得た。

【0053】次に、アスペルギルス・オリゼのエノラーゼ遺伝子を含む2.9-kb BglII断片 (Biosci. Biotech. Biochem., 60巻161-163頁, 1996) からエノラーゼ遺伝子のターミネーター領域0.6-kb EcoRV-HindIII断片をpBluescript (ストラタジーン社)のEcoRV-HindIII部位にサブクローニングし、プラスミドpBET (3.6 kb)を得た。

【0054】プラスミドpBRJAPからアルコール・デヒドロゲナーゼI遺伝子プロモーターとそれに続く大腸菌由来 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子を含む2.8-kb PstI-EcoRI断片を取得し、これをプラスミドpBETのPstI-EcoRI部位に挿入して、大腸菌由来 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子発現カセットを含むプラスミドpBAPETG (6.4 kb)を得た。

【0055】(2) 大腸菌由来 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子発現カセットをアスペルギルス・オリゼへ導入するためのプラスミドの構築

プラスミドpBAPETGから制限酵素PstI及びHindIII消化により、3.4-kbの大腸菌由来 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子発現カセットを取得して、アスペルギルス・オリゼの形質転換マーカーとしてniaD遺伝子を有するプラスミドpN3 (特開平6-245777)のPstI-HindIII部位に挿入し、本発現カセットをアスペルギルス・オリゼへ導入するためのプラスミドpNAPETG (11.6 kb)を構築した。

【0056】(3) 大腸菌由来 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子のアスペルギルス・オリゼでの発現

プラスミドpNAPETGをUnkelsらの方法 (Mol. Gen. Gene 30 218巻 99-104頁, 1989)に従ってアスペルギルス・オリゼniaD欠損株A01.1に導入した。得られた形質転換体を3%グルコース及び50  $\mu$ g/ml 5-プロモ-4-クロロ-3-インドール- $\beta$ -D-グルクロニドを含むCzapek-Doxブレー\*

\*ト上で30Cで10日間培養したところ、コロニーが青色を呈した。対照として得た形質転換マーカーのみを有するプラスミドpN3由来の形質転換体は青色を呈しなかった。このことは大腸菌由来 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子がアスペルギルス・オリゼで発現し、発現した $\beta$ -グルクロニダーゼ酵素が基質5-プロモ-4-クロロ-3-インドール- $\beta$ -D-グルクロニドに作用したことを示す。

【0057】青色を示した形質転換体の1つを栄養培地で生育させ集めた菌体を洗浄後、3%グルコースを含むCzapek-Dox培地で8時間培養し、得られた菌体の無細胞抽出液中の $\beta$ -グルクロニダーゼ活性をJeffersonらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 83巻, 8447-8451, 1986年)で測定したところ、比活性は78 nmol p-ニトロフェノール/min/mg-蛋白質であった。これに対し、pN3由来形質転換体は、<1nmol p-ニトロフェノール/min/mg-蛋白質であった。

【0058】

【発明の効果】本発明により、アスペルギルス・オリゼ由来の新規なプロモーターが提供され、当該プロモーター配列を含むベクターにより形質転換されたアスペルギルス属糸状菌における外来蛋白質の生産が可能である。

【0059】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1829

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: アスペルギルス・オリゼ

配列の特徴

特徴を示す記号: promoter

配列

```

ATCAATTTAA AGGCTATAGA TGGCTAAGAC TTTGGGGGCG ATACAGATCG GAGTGTGGA 60
AAGGGGCTTG CTTTCGTTTG ACAGCATAAG CTATCGTGGT GTTACAGCGG TAGCAAACAC 120
GTGGAACAGG AATCCTTATA TTGTCTAGAT CATAGACATG TCAAACATTT CAGACAATCC 180
CCTTCACTAG CAGACTACAC ACCCAAATGC TATCAATGAA GAAACGGACA GAATTATATG 240
TACTTCTACA GAGGGTGGAG GTCAGGTGGC TTCCGAAAGG TCCTTCGCCC GTAAGGTACT 300
CCTGCTAGGC TTTGAAAGTT TTA AAAAACC CGCTATCTGC CCTCAAAAAC TCTTTTGTCT 360
TTCTCAATTG ACAGGAGGGT CTGCGCGGAG GATGTTATTG TCTCCGTATC CATGAGTGCG 420
ATGAGAGAAG ACAGTAATGA TGACGACGAG AACAGAATCA CAAACAAGGT GATCCTACAG 480
ATGTTACTGA AGACACCATC TGCTCTGGGT CGTAAATTG TCGCTGACTT TCAGGGAGAA 540
GTTCAAGTCT TTCTTTTATA GCAGGAAGT AACC GAATCA CCGACCTCAT GTTCCATACG 600
GCTCGCTGGT TAGTCGTCGG GATATGGGGA AGCTGCCGCT GTTAGGTATC AGGATTATAC 660
ATTAATTTGC GGTGCCTTCC ATATGTTGAG CTCGTACGT CCGGGGTCAG CATGGGAAGA 720
ATTAGATGAA AGCGCAGCCA TCCCGCATCT CAGCAAATCC CGAGAAAAAG CAAGCAAGAA 780
GGAAGGGAGG GGGTTTAACG GAGTAGATGG GGCGAAGTGG CTGCCATGCT GAACTATTAC 840
GGAGTACATA GCGAGAAGTA CGAACATCCA CCAACACAGA AACGGAAC TA GCGGCTCACA 900

```

11

12

```

ATTCGCGCTG AGGCATCCAT GCCATCCTTA AAACCTGACTA GGGTTGCCAC TTCCATTGGC 960
CATCAGTCGA TCGAAATCAT CTGATTTGAA GGGTCTCGGT TGAAACGACA CTACAGTATC 1020
GAACGGGATT TGCTTCTGGA GTCTCCCAGC TTGAGGTGGA GTCTATCTTA TTCGGTGGTC 1080
TATCCCGAAA TTAAAAGCTT GACGTTTGAC AGGGAACCTT TAAAAAAGAA GAAAAGAAGA 1140
TCCTTTCTTC TTTCCCGCA TGAGATACGG CCAATTTTGC TATATTGGA AAGGCTTGGC 1200
CCAGGATCTG GACTCACTTG ACAGGGAAGC CTTTTCGGGG GAAGGGAAAG TCTGTGACTC 1260
TGTAACGGAG TACTACTTCG TACTTACCAC TTACTACTTA CTACTGACTT GTTAGTTTAA 1320
AATCGAAGGA AGTGCTTATG CGCCATCGTA CCGATCGGGC AATGAGCCTA ACCCCGATGA 1380
CGTCGGCCCA TGGATCTCCT GTTGTGCGG TTCATTGGT GGGCTGATAA TCTTCCAATG 1440
ATCCAAAAAT CGTTTGATCG TCTTGGAATA GCTTCGGTGT GTCTCACAGA TTCTCTTTCA 1500
TGGTTTTTTG ACCTTTCCTT TCCCTCTCTC CGGTGACTCG TTTTCCATAT GTCGGTCTAG 1560
ATGTGCGTGT GTATCACTAC AACACCATTC ACCTTCATTC ACCACTATTA TTCCCACCTT 1620
ATAATACGAC GTCATGCCA TGAGATTCCC GGGTTGGATG ACCGTACCCC CACCCATTGC 1680
TTGGATTCTA GACTTCTATA AGAAGTGTCC AGCGTCTCAC CATCAGCTTA CTTCATTTC 1740
TCATCACTTC TCTCATCGTG TAAATCAACC CTAATCCAC CGCAACCTCC TTTCTTCCCT 1800
TTCTTTCAAC ACAAGATCCC AAAGTCAAA 1829

```

【0060】配列番号：2

\* 配列の種類：Genomic DNA

配列の長さ：1887

起源

配列の型：核酸

生物名：アスペルギルス・オリゼ

鎖の数：二本鎖

20 配列の特徴

トポロジー：直鎖状

\* 特徴を示す記号：promoter

配列

```

TAAAGGGAAT ACGGAAAACC TGATATAAAC GCCTGCACAC ATGAAGAATC GCCGCAAGTC 60
TAACCACTGC ATTCGCTTCA TACCGGAGTG GCTGGTCACA CACCGGCCCC TAAAAAAGAA 120
CACATACTGA CGGCGAMGAG TTACATATCT TGGGAGAACT GCTTATCAGA GCTTAAAGAT 180
CGCCGAAGTG TTTCCCGCG AATACCTAGA GACTATGTCA ATATGTGCG AAAACCGCCT 240
TTGAAGAATA AAGCATACGT GATATAAAGA AAGCCATCTT CATCCTTGTG TTCTTCGTAG 300
ATGCTGCTCA TAAGTGACAG TGTGGTGGT AGCACCTCGT CGACGAAGAT GAAGATAGCC 360
TTCTCGGGAG ACAGTTTGAT GCGCTTGGG ATAACATAGA CGAACTGCCC GACGGTAAGG 420
TCTGCAGGAA CAAGATACTT CTCTTATCA ATAGTGGCGA TGTCCGACTT CTCGACTTTC 480
TCACAGATTA CCTACAAGTG AAACCTGAGT TAGCATTCTA AACAAGCGGT GAGTAGACAT 540
CTTGCTTCCC TGAGGAAGAA CAGCTCAAGG GCAAGAATCA TCTACCAAAG TACGGATCAG 600
ATAGAGTTGT GCGTACTGGA ATGCGATCAG CGTATTTCTG ACGGATACGC TCGGCTTCTG 660
CCTTGGCTT CTCAAAGGGG TGCTCGTCT TGAAGTTGGA GCGCATATTG ATGGATCGAA 720
TCAGTTAATG GATACAACTA GGTGCGTTTA CTATGAGTAC TAGGTACATC AACGAGATAG 780
ACGTAGATGG TGTGAGGTGC AGAGTGATGT AAATGAGATG GTTGGTGTAA TAGGTGAACA 840
GTAGGAAGAA GGTGGATGAT GACAAAAGG AGAGCAAAGC CCCGCGTCAT GGGTAGTACC 900
ACGGCTGATA AGGTCGTGAG GCAAGAGCGG ATCAGGGGT GGAGGCGGTG AGCAGCCCCA 960
CACGTGAGTC ACGATCAGCC TTGAGCCTTC AGGTGCCCCA AGTCATCCAT TTAATTTGAT 1020
TTGATTTATG TCATCTTCAT TAAACAGATA GCTCATGGAC ACACGTCATA TTCTCACGTG 1080
GGGAGCCTGG GTGATGTCCC GGTGATATCG GGTCTATAGT GCCCTACAAA GATGTACTAC 1140
TGAAGTGAAT AGCTGTGGT AGATGCGGTG TCCGCCTCCA CCGTATCAGC GGCTAGACTA 1200
CTGGTGGCG CTGTCTCCAT AGAGGGCTCT TGATAGGCTC TGTTCCTGGA ACTTGTAGTC 1260
GGTATTACAA TCATAGTCAA GTTCCAAGAG TATATATAAT CCCAATTCTG TGATGACTCT 1320
CACTCAACTT AATCTCATT CAAGCTGCAT TATGACAAGC CAACAACCTT ACATGCATGA 1380
TCAACTCGAT GGCCAATCCT CAACGCAATG CAAACCAGGC AAACACTTTC TCACAGCGTC 1440
ATCTGACTAA GCAGGAAGTG GGACATGTGC CAAACAATGC AAACAGCGTA TATCCCGGAT 1500
ATTCTGACGA CGAGTGGTCC CATACAGTTC CAGTCCAGAG AAGGTAACCT CACGATTAGG 1560
CTACCTCTAT TTCTTGAGAT AGGTGGAGCC GTTTGAGAGA GCGTGACCCC ACTCATATCG 1620
TTCCGGTACC ACCTGATCAT TCCATCTATC AGCCAATTTT CAATTCCATC TTATAAACT 1680

```



13 ~

14

ATGACCTTGT CCCGGCAATA TATGCCTCTT CGGAGGTAC TCTGCCACTT CTCAGCGCAG 1740  
 ACCAGACGCG CACCTTGCAA CTTTCAGAAT ACATTTCGCA GATACTCAGC GAAAAAGCGA 1800  
 TCCAGCGAAC CGAAATCTTT TGTCGTGTGG AGGCCATACC TCCGGCTGGC CATTGGTGTG 1860  
 CCATTCATCG GAGCTCTGAT ATATTCC 1887

【0061】配列番号：3

配列の長さ：2091

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：アスペルギルス・オリゼ

配列の特徴

\* 特徴を示す記号：promoter

配列

GCARGTAGAH TAGAACACAT TTGCCATCCC GTAGAACCGC CAATAGTAAA AWTGCGGTG 60  
 CCATAAGGTC GTCGAGGAAC GTCGGTTGGT TTCCATGAGA TTGCCGCCGA GCAACAATGC 120  
 ACGACCCGGA TTTTGATTTA CTGATTATAG GATCGTTATT ATAGACAGG AAGGAAAAAG 180  
 AAGCAAAGA CAAGCAAAGA CTATCAAGAG ACATGAAGG AAAAAAGCTA TACAAACACA 240  
 TGATTTAGGT TGCATGATGA CTTCCGTGAC TGTCATACCA CCGTGCAGTG GACCACGAAG 300  
 AGAGTCGCT AGATGCTCGA CTTACTARAC GGGTTAACCG CTTCTGTTGA TCTGCATGCA 360  
 GACTTTTCCC GACTAGACTC AATCCAATAA GGCGGGCGTC CGTACGGCAT GCCGAKATAT 420  
 CCCGTGTAGG GTAACGCGT GGTGTGACCC GGRGGCSGAA ATGGTCGAGT CTGAGAGATT 480  
 TTGCGTCGGC AAGTCTGCCG AGTGGGACCA CGGCCAACGC AGGAGAATAG GAAATCTCAG 540  
 CGTGTGTTG TTGAGACTAA AGTTGCACCA KTCACATCG GCTCTGCTGA AGTCTGCACC 600  
 TCTCAACAGT GGTGGATGA AAATCCGACA GTGGGTGCGA CGCCAAGTGC CTTGATGCGA 660  
 CGATCCACCA GTCGAACGCA CCAGCAGAAA TTTTCTCCT AAGTTAGGGC GAASTATTTC 720  
 GTATGTGACG TCGAGTTGAC CGAATCGGCA CACCGAGTCA CAAACGGATC ACGNTGCCGA 780  
 CTTCTCGGAC GGCGATAGC TTCGGAACGN TTCCAATGAC ATACATACAC AGCAGAAGAC 840  
 ATGCATGGGA CATTCTGTA GGTATTGTAG TCAGATGATG TTACCTTCCA CCCAATATTG 900  
 ATTTGTAACC TTCGTATCCA TATTATTTT TGAACCAAGA CTACAGGGTA TTGGCAGAGA 960  
 GTTCGGATGC TGCATGAGTT GACTTTATCG GCATCATTAT TACCTTTCAC TACCCGACTC 1020  
 GGGATCGCCC AGAAATTTTT TTTCTTAGGG TGGATCCATT TAGATCTGCC ATGACTCTTG 1080  
 GTACCAGCTC GGAACCAGAA AACTTTACTG TGTGTCTTCA GGGGAGCTAT AATTAAATTT 1140  
 AGGGCAAGGG GAAAAAATAA TGAGTGAGGC AGATTGAAT GGGCCTCGTT AACATCGTTA 1200  
 AAACAACCTCT GTTGAGAAAG GAGTCAAGGG ATGTAGTGGA TCGTCAAATG TAAACAATTG 1260  
 TCCGTAAATA CCCCCGTACA CACACCAACA GAGTAATTGT GCGTGTGAAT CCTGAGAAGT 1320  
 ATGTGGCAAA GGAATTAAGC GTGTAACAG AGTCAGTGAA CTAATATTA CTACCACCGT 1380  
 GAGACAACAC GGGAAACAA ACTACGTAGT ATCTACAGTG TGAATGGAA TAATCGAGAT 1440  
 ACTACCATAG GACTACAAA CTTGAATTTA GAGGATTGGG TAATAAAAAA TAAATAAAT 1500  
 AAAAATAAAA AATAAAACC AAACCAGACC ATCATGAGAC GCACATGACG TCCCGTGAC 1560  
 TACTTTGTA GAATTCCAGA CTCTCTCAAG TTCGCTTTC ACGATAGCAA GACGGCGAGC 1620  
 CCGGCAACGA ACCTCAACCC ATCCATGCCA ACGATAACTT TACTCTTTG TCGTCTTCCA 1680  
 GGCACATCCC CACTGTCTCC CCACTCCAAG AGACTCTGTC GAAGCATCCA AGAACACACT 1740  
 CCGCCCCCT AGCATGCGAC TATCCTTCCT GGTTCGGCCC TTGAGATCTG GGGCCCCGTT 1800  
 TTTCTTGCCA TGGTCCCTAC CCGAGAATG GGGTGTCTC CAATCCCTGG GATGGAGGCG 1860  
 ACGTTTGTG TTGCCGAGT ATGGACCGTT CATGTAAAAC CTTTCATTTA ATTTTCAATT 1920  
 AAGCGCACTA AATAATTCCA CGATGCGGTT ATTAAGTTCC GACTCTGGG TATATATCTC 1980  
 CGCGCTCCC ACGTTGCCTC CCGGTTTCC TTCTCTTCT CATCCATCT TTCATCCCTT 2040  
 CACCAATCTG TCTAAGGATT GTTCGACCA TTGAGGAATC CATCCATCAT T 2091

【0062】配列番号：4

配列の長さ：1915

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：アスペルギルス・オリゼ

配列の特徴

50 特徴を示す記号：promoter

15

16

## 配列

```

ATTCTATAGA CTTGGTAGAA GTAGAACCTT CCCTGGTCGT ATATGGAGTA CCGAACGCGG 60
TGGGCAGTAC ACCAGCAACA CCACCAGCGT ACACACGCTC AACAGTTCGC GTCGCTAAAG 120
GCGCGCGACC GCGATAGTGG CATACTTCTT ACAAGAGAAA ACAGCGCGAG ATTAAGTCAC 180
GACAGTAATG AATTGGATTA TTCGTCATAG AATCTGCATT TCGAATCTAT GCCATCCGGT 240
GGCAATTCAT AGAGAATACC ACTTGGTCAA GTAAAATTTC TTAATGTACA TGCTCGGATG 300
CATCCCATGA GATCCAATCC ACTCAGCCGC GTCGTCGGCA GCCTACTATT TATTGCGCAG 360
CAAAACGAAA ACTAATCCCA GTGCCGAAAC CCATTGATAT TCGCAAATGA AAAAAAGAA 420
CCCATCATGT ATGCCAGTC GTGAAAAAGA AATAAAACCC CTAATCGCCT ACCCAGAGAC 480
AACCAGAAAA ACGGACTCA TTAGAGAATA ATCTAAGAGC GCTCACCACG GAGACGGCGG 540
GCGAGCTGGA TGTCTTGGA CTGGATGGTA ACACGCTTGG CGTGGATGGC GCAGAGGTTG 600
GTGTCCTCGA AAAGAGAGAC GAGGTAGGCC TCAACGACT CCTGGAGAGC ACCGATGGCG 660
GAGGACTGGA AACGGAGGTC GGACTTGAAA TCCTGGGCGA TTTCACGGAC CAGACGCTGG 720
AAGGGGAGCT TCGGATCAG AAGCTCGGTG GACTTCTGGT AGCGACGGAT CTCACGGAGA 780
GCGACGGTAC CTTTTCATGA CTGTTAGTGA TGACGCGATG ATGGTTTGCC ACATCATAAG 840
ATAACTTACC AGGCTTGTA CCGTGAGGCT TCTTGACACC TCCGCTAGAG GGAGCAGCCT 900
TACGGGCGGC CTTGGAGGCG AGCTGCTTAC GAGGGGCCTT GCCACCAGTG GACTTACCTG 960
GATGGATGTT AGTGATGATG ATTCAAGACG CGATGTATCA CTCATGGGGA CGCGACCCCTG 1020
ACGCGGGGCG ACGACACCAC AAGAGAAAGG ATAGTAAGGT TAAGACTTAC GGGCAGTCTG 1080
CTTAGTTCTG GCCATCTTTA GAGATAAGGT TTGATGGATT TAGTCGACTT TGAGATGAAA 1140
ATAGATAAAA GTCGATGGTT GTCGATGATA ATGTGTTGGC GGATGAGGAG ATGAAAGAAG 1200
GATGGAGGAG GCGGGTGGG GAAGGTATTT GTAGTAAGCG AAGGGTGGT GGTGATCTGA 1260
TGGCGTTGCC AGCAATTTGG GTGGCCTTAG CGTCGTTTCC CTTTGATCAA AAAAGCGCTC 1320
GGAAAGCAGC ACACCATAAG CCGTGATTTC GGGGGTCACT TTTGGCTGCA GAATCAAAGG 1380
GTTACCTTGC GGGCGGTCAA GGAATCCGCG CCCAAGGCAG GAATGAAGTG TGGTCTGTGC 1440
GTAAAGCGAG TGACGGACCA ATAGAATCGT AGGATCACTG ATCTAGCCTG TCTCCCTACC 1500
ACGCTTTGAT CCCAACCACC GGTAAGGTAT GTGAAGTAAT TCAGTAGATC AAAATGAAAG 1560
TTGGTATGCT CAGGAATATC TCTGGTCAAT TTTGATCCCT GATCTCGGTG GTTCAGAGGC 1620
ATTCGGTGAG GATCAAAGTT GATCGTAGCG GAATCATCAC TTCTCGGTCA CGTTGCCGAC 1680
AGATCAAACC CGCCGGGAGG ATCCTCGTCT CTCATTGCTC GATCCTCTTG TAGCGCGTGA 1740
TTCCAACGCC CTCCCCGCGC TCTTCCTTTT CCTATACAAA TATCACCCGT CCCATGGCAG 1800
CTGTCCAAT CTTTCCCTTC CCATCTCTCT CACATCTGTC ATCCAATTAA CCACCTATCT 1860
CTCCACATTT TCCCACTCAA CCTTAAACAA GTTAACTCTT TAATCAACCA TCAAT 1915

```

【 0 0 6 3 】 配列番号 : 5

\* 配列の種類 : Genomic DNA

配列の長さ : 1569

起源

配列の型 : 核酸

生物名 : アスペルギルス・オリゼ

鎖の数 : 二本鎖

配列の特徴

トポロジー : 直鎖状

\* 特徴を示す記号 : promoter

## 配列

```

ATCGGAGGTC TTGGGCTCAA TGAAGTGAAT ATATAGTGGA GGGCTCTCCG CACTACTTTG 60
TTGAAAGAYA ATCGATACTT GCTCGATTTA GTAGTCAAAG CGCGAACTG AGCCTTTCCA 120
TGGCAATAGT CAAATGAAAT AACTACTGGA CTAGATCTCA TCATCAAACC ATTGTATGTT 180
TAGCTCACGG GGATGTTGTT CCTCGGTTAC TACCCGCTTT GTAGAGTCAT GGAGCAGAAT 240
TCCGAAATGA GTTATAGTGG GCAAAAAACA TTATTCTTAT GTTGCCAGAA AAAAATACTA 300
CGTTTTTCTC CTTCAACCAT TGTCTTGGCA GTCAACTAGC AGCATATCAG ACTGTGACAG 360
TAGTCCGTTG CCCTCACCGG CCTATCGGAC GAGGTGTTTT TGTGTTGCTA CCCTTCTGGG 420
TTTAGTGAGT TGGACCAGAT TTTGGTAAAT GTTGACGCTG ACTCGGGTCA CATGAGGAGC 480
TCTTCAAAGA GTGCGCTATT CCTGAACAGG TACTCTTGAC GCTAGGCAAT TTCAGGCACA 540
ACTCAAGGCG CCCGCAAGTG CCGCTCAGT GGCCTACTCG AAAATACCAA CTCTTTGGGT 600
GTGGTTCGCT ATAAGGGCTT TCGCCTTTAC ATAGTGACAT GAATAACCAC GGAGTATATA 660

```

17

18

GGTCCTTGGC TAATCGTGGC AAATCCAAGT ATCGATTCAA CTGCATGATT GTGATAGCTT 720  
 GGTAGAGTAG CATAGCGGCA AGAGCAATCT CCGAGATGGC TAATATGAAG AATTTTACAA 780  
 GATACTCGGA CATAAGTCTG CAGAGGTGAC TTCTCAAAGT TCTTTCCTGG AGGCTGTTCA 840  
 ACGCGATGCC ATTCTCTTGA CCCCACATTG ATTGAATACG TCCCCACAG CTTCCTGGA 900  
 ACATGTTGGC TTGTGCCAAG TGAGAGCAAT CGTACCTCAT CTCATCATAT ATGGATATAT 960  
 GTCGTATACC TGCTTCCGAA GGTGAAAGT CAAGGATGGA AAAGAAAAAG GAGGAGAGTT 1020  
 CTAGATTCAT GCGGGGAGT GGTGTGGTG TTAATAACTT ACTCCGTACT GATCCTACGA 1080  
 CTGCCAGGTG ATATTGATAT GAATATCGAA TGATGATTGG GTGGATGGGG TTTGTTCCGA 1140  
 AAGAGGGTTA GTTCGTTGTG GAAGGGTAGA TTTTACGATT GGAAGATAAT GTGGGATAGG 1200  
 GCTAACGCGG CCTGCCTGAA CCCTCAGGCC GGAGCCGGT GTTACATACT GACCGCCAG 1260  
 CGGCTGAGTT AATGAGAAAC TACACATGAT TCGAAGTTTC AGGTCGATGG TGGAGGGGAT 1320  
 ACATTCAAAA TTAGTACTTA AGAGAATTAA ATACGAGGCT AATGAGGTTA ACTGCTCTAC 1380  
 TTACCCACG AGAGGAGGAA AACTGCACC ATCATCGTTT GGTGGTGTG GTCATGTGAT 1440  
 CTTCAATCAC CTGACTCTGA ACCCGTTAAG CGAGACTTGG CAGAAATCGG AATGCACACC 1500  
 AAAATTGCCC ATCCTCAGAA CCACCGAAC AACATCGCAG CTTTCGAGGT CGACAACATA 1560  
 TACGCCAAA 1569

【0064】配列番号：6

\* 配列の種類：Genomic DNA

配列の長さ：1631

起源

配列の型：核酸

生物名：アスペルギルス・オリゼ

鎖の数：二本鎖

20 配列の特徴

トポロジー：直鎖状

\* 特徴を示す記号：promoter

配列

CAGGTATTTC CTTTAGTGGG TCCAGCCTTA CCATTTCCTT GCATTGAATG ACAACACTGT 60  
 CGCATTTTTT ATACGCCAAT AATAGCCATG GCCATTCTCT CACAACATCA CAGGTCAAGC 120  
 AGACTGCAAG TGGTTTCTTG TGGTGGCTGT ACTATCAAAA CGATAGAATT CCCATTGCT 180  
 TCGTTGGCGG TAGTAACCCC CACCAATGCT TTGTGGACTT GATGAAGTGT ACACGTCAC 240  
 TGCCTGTCAA AATGGCAGT AATACATTCC AATCCACAGG CTAGAAGGCT TGTGCGGTGT 300  
 CCACAGACGA TCAATCCTCA TAGGTTTCTG ACAGTCTCAC CCAGTGTAG CCGTCGATGC 360  
 GGTCTCGTG GTTATGCTTT CATTATCACT CCATATGTCT CTGCTCTCCC TCTCCACTGC 420  
 GCGCATAGCT TGAGCAACCT CCTCAAGCTT AGCTACCACA TCCAATAAGC CGTTGTTGAC 480  
 CCTATCGAAA TAGCGATCAT TCGCTTCAAG CCTCTCGCGT GCCAGAAGAA TGTCTTTTC 540  
 TGTTTCTCA TCTAGATTCC TCTGGGAGGC ATCATCCGTT GCGGTTGTT CTCCCGTGTG 600  
 ACTAGTGGCA GGAGAGGATG CTCTTGGTCT TGATTGACTC TTGGTAGCTG CATTCTTCGG 660  
 ATCAACTACC TCATCAGCTT CGCTTCGAGC CCAGGCCTGG GCAAGCCTCA GCTGCTTTGT 720  
 TCGCAGGTCT TCAAGGGCCT CAGAGTGTCT TTGCGCAAAG ACATGTTTAC TAGCTACCGC 780  
 ACTCAGCTCG ACCTCTGACA AGGCATTCTG CATTCTTTCG CAGATGGCGT CCGAGCGATC 840  
 AAGTTCGCCT TTTGATTGTG TACGAGATAG AAAGGGGAG AGAGAGCCTG GGGTCTCAAG 900  
 GCGGCCTTGC TGGCGGAGG AACGATTCCG CTGCAGCGCA GGACGCTGAA CCCCTCCACC 960  
 GGGAGAAACC GAGGGCACCG GAGGTGTGAG AGATATGTTA GATCCATTAT GGAAGTGGG 1020  
 TGGACCTTGA AAAAGAACAG GGGGAGGGAG ACGCGCAGAG GGAATTTTCC TCAGATTCTC 1080  
 TAATTTTGA GCCGCATCCA TGGTGTTCGC GAAGTATACG TTGTTGGCAG GCGAACTAAA 1140  
 ACAGAACAAG CTCCAATTGA CAGCGTAAA TAAAGGGAGC TTAATCTCCG CATACAATCA 1200  
 ATGCTGACGG TCACTGATAA GGGGCTTATC GATATCGGAG AACGGCGGAA GTTGTTCGGA 1260  
 TCCCGTGCCT CGCTTAGCGG CCGATTAGGG CGGAGCGCGC ACAGCAGAAC ATTTTGGTGA 1320  
 GCCTTCAGCG ACACCGCCGG CCGTGAAAGG AACCTTTCGA CTCTCGACAA CCATCCCCAT 1380  
 CAGGCCTTTC GGCAATCTAT ATCAGTCGGT ATGTATATTG TTGCTGCTAT TTTTGTATGA 1440  
 AATATATTCTG TGTCTAGGGA CTCCCGTTCA ACATCGAATC TTTTGATTTT TGATTTTCCA 1500  
 CCGCCCGGC CATGTACTTC TGAATCCAC GTCCCTCCA CAAATCACGA AATCACCAG 1560  
 CATCAGATTG CCACAGCAAG ATCTAACGCA TTCTTCTTCT ACAGACCGTC CTTCGAACAT 1620  
 AATCCGCCAA G 1631

【図面の簡単な説明】

\* ターの単離法を示す図である。

【図1】 本発明のグルコース存在下で発現するプロモーター\*

【図1】

